

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005年6月9日 (09.06.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/051956 A1

(51) 国際特許分類⁷: C07D 493/22, G01N 33/02 (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/017598

(22) 国際出願日: 2004年11月26日 (26.11.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2003-399683
2003年11月28日 (28.11.2003) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 財団法人浜松科学技術研究振興会 (HAMAMATSU FOUNDATION FOR SCIENCE AND TECHNOLOGY PROMOTION) [JP/JP]; 〒4328561 静岡県浜松市城北3-5-1 静岡大学浜松キャンパス内 Shizuoka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 石田 均司 (ISHIDA, Hitoshi).

(74) 代理人: 津国 肇 (TSUKUNI, Hajime); 〒1050001 東京都港区虎ノ門1丁目22番12号 SVAX TSビル Tokyo (JP).

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

A1

WO 2005/051956 A1
(54) Title: BREVETOXIN DERIVATIVE, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME AND METHOD OF DETECTING SHELLFISH NEUROTOXIN USING THE SAME

(54) 発明の名称: ブレベトキシン誘導体、その製造法、及びそれを用いる神経性貝毒の検出方法

(57) Abstract: It is intended to provide a novel shellfish neurotoxin. Namely, a novel shellfish neurotoxin having the formula (I); a method of synthesizing its component; and a method of detecting the main component of the shellfish toxin by using the component of the shellfish toxin to examine the occurrence of a shellfish neurotoxin.

(57) 要約: 新規な神経性貝毒の提供。式(I)を有する新規な神経性貝毒、その成分の合成法、及びその貝毒の成分を用いて神経性貝毒の発生を調べるために、その貝毒の主な成分を検出する方法。

明 細 書

ブレベトキシン誘導体、その製造法、及びそれを用いる神経性貝毒の検出方法

技術分野

[0001] 本発明は、毒化貝類中の神経性貝毒、その製造方法に関すると共に、その貝毒を用いて神経性貝毒を検出する方法にも関する。

背景技術

[0002] ニュージーランドにおいて、1992年12月から1993年3月の間に、二枚貝の摂取による神経性貝毒による中毒が発生した。これは、渦鞭毛藻 *Gymnodinium (G.) breve* の赤潮にさらされた貝を摂取することにより生じる食品中毒であり、患者に特徴的な神経系症候が現れるために、神経性貝中毒(neurotoxic shellfish poisoning: NSP)として知られている(非特許文献1及び2)。海中の特殊なプランクトンによって生成される毒成分が貝類に取り込まれた結果、人がその貝類を採集して食した場合に神経性貝中毒などを発症するが、これまでに、これら神経性貝毒として、図1に示すような、PbTx-2、PbTx-3、BTX-B1、BTX-B2、BTX-B3、BTX-B4等のブレベトキシン類が解明されてきている(非特許文献3, 4, 5及び6)。しかし、貝類からのブレベトキシン類等の毒化合物の単離は極めて困難であるために、これらの化合物の研究及び新規なブレベトキシン類等の検索は殆ど行われていない。

非特許文献1:McFarren EF, Silva FJ, Tanabe H, Wilson WB, Campbell JE, Lewis KH..occurrence of a ciguatera-like poison in oysters, clams, and *Gymnodinium breve* cultures. *Toxicon*. 1965 Nov;3(2):111-23.

非特許文献2:Morris PD, Campbell DS, Taylor TJ, Freeman JI. Clinical and epidemiological features of neurotoxic shellfish poisoning in North Carolina. *Am J Public Health*. 1991 Apr;81(4):471-4.

非特許文献3:Ishida H, Nozawa A, Totoribe K, Muramatsu N, Nukaya H, Tsuji K, Yamaguchi K, Yasumoto T, Kaspar H, Berkett N, *Tetrahedron Letters*, Vol. 36, No. 5, pp.725-728 (1995)

非特許文献4:Nozawa A, Tsuji K, Ishida H. Implication of brevetoxin B1 and PbTx-3 in neurotoxic shellfish poisoning in New Zealand by isolation and quantitative determination with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Toxicon*. 2003 Jul;42(1):91-103.

非特許文献5:Ishida H, Tsuji K, Sea food poisoning caused by brevetoxins in New Zealand. *MycToxin*, No.48, pp.29-31 (1999)

非特許文献6:Ishida H, Muramatsu N, Nukaya H, Kosuge T, Tsuji K. Study on neurotoxic shellfish poisoning involving the oyster, *Crassostrea gigas*, in New Zealand. *Toxicon*. 1996 Sep;34(9):1050-3.

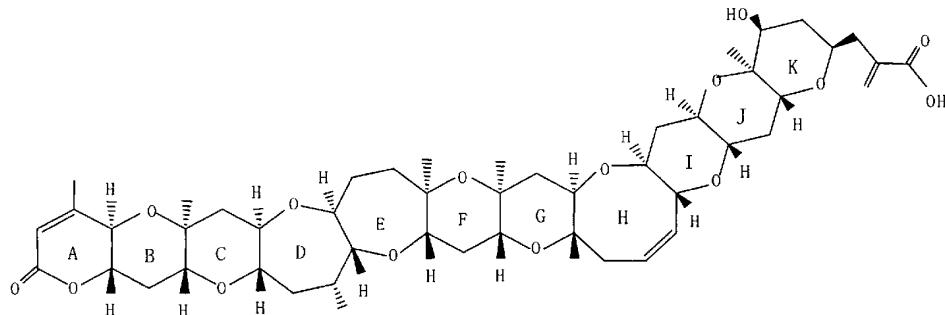
発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0003] 本発明は、神経性貝毒であるブレベトキシンの新規誘導体を提供することである。

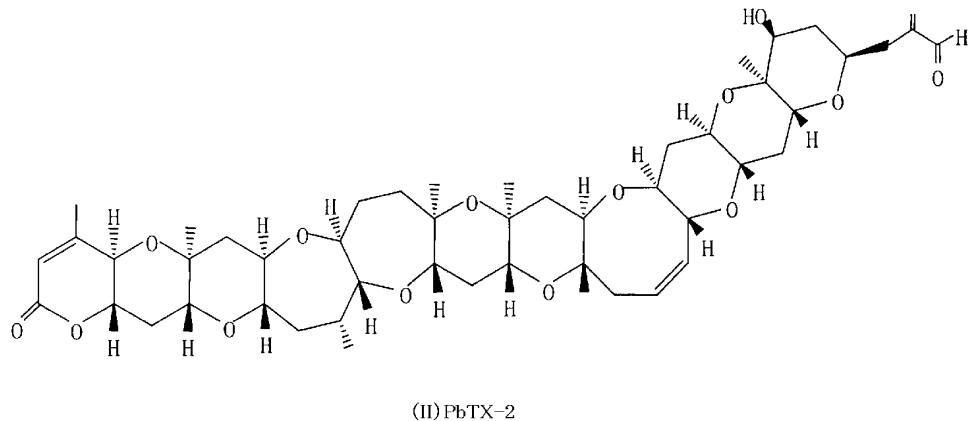
課題を解決するための手段

[0004] 本発明は、式(I) :



を有する化合物に関する。

[0005] 本発明は、式(II) :



を有する化合物の末端に位置するアルデヒド基を酸化してカルボキシ基とすることを含む、式(I)を有する化合物の製造方法に関する。

[0006] さらに、本発明は、貝類中に存在する式(I)を有する化合物を定量すること、およびこれを神経性貝毒のマーカーとして使用することを含む、貝類中の神経性貝毒の検出方法に関する。

発明の効果

[0007] 本発明により、他のプレベトキシン類に比べて、比較的多種類の貝類の中に良く見出され、しかも比較的安定である新規なプレベトキシン化合物(プレベトキシンB5(BTX-B5))を提供でき、また、これを用いることにより貝類中の神経性貝毒の検出を行うことができる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]図1はプレベトキシン類PbTx-2とPbTx-3、及びその類似体BTX-Bの構造を示す。

[図2]図2は、BTX-B5の(1) (a)構造決定、並びに、(b)その炭素及び水素原子の配置、更に、(2)BTX-B1の炭素及び水素原子の化学的シフトのために使用されたNMR技術手法を示す。(a)太線及び矢印は、 ^1H - ^1H COSY及びHMBCによって指定された部分構造をそれぞれ示す。(b)添え字の番号は、 ^{13}C NMR (^1H NMR)化学的シフト、 CD_3OD 中でのppmを表わし、矢印は、エーテル結合の周辺における差NOE測定(実験) (NOE difference experiments)によって観測されたNOEを示す。

。

[図3]図3は、前駆体として m/z 909.5での分子イオンと供のBTX-B5のネガティブFAB CD MS/MSスペクトルを示す。

[図4A]図4Aは、標準BTX-B2(50ng/mL)の10 μ lの選択反応モニタリング(SRM)液体クロマトグラフィータンデムマススペクトリークロマトグラム。[SRM検出で使用された前駆体-プロダクトイオンの組み合わせ及び極性が示される。]縦軸:強度($\times 10^4$)横軸:保持時間(min)。

[図4B]図4Bは、毒化トリガイ(g/mL)の80%MeOH抽出物からの80%MeOH画分の10 μ lの選択反応モニタリング(SRM)液体クロマトグラフィータンデムマススペクトリークロマトグラム。SRM検出で使用された前駆体-プロダクトイオンの組み合わせ及び極性が示される。縦軸:強度($\times 10^5$)横軸:保持時間(min)。

[図4C]図4Cは、毒化ムラサキイガイ(g/mL)の80%MeOH抽出物からの80%MeOH画分10 μ lの選択反応モニタリング(SRM)液体クロマトグラフィータンデムマススペクトリークロマトグラム。SRM検出で使用された前駆体-プロダクトイオンの組み合わせ及び極性が示される。縦軸:強度($\times 10^4$)横軸:保持時間(min)。

[図4D]図4Dは、毒化沖カキ(g/mL)の80%MeOH抽出物からの80%MeOH画分10 μ lの選択反応モニタリング(SRM)液体クロマトグラフィータンデムマススペクトリークロマトグラム。SRM検出で使用された前駆体-プロダクトイオンの組み合わせ及び極性が示される。縦軸:強度($\times 10^5$)横軸:保持時間(min)。

発明を実施するための最良の形態

[0009] 本発明の式(I)を有する化合物は、貝類中から後述の実施例に記載のように抽出し、単離することができる。

[0010] 本発明の式(I)の化合物は、式(II)を有する化合物の末端に位置するアルデヒド基を、例えば酸化剤を用いて、酸化してカルボキシ基とすることにより合成することができる。式(II)を有する化合物は、PbTx-2として公知であり、Lin Y.Y, Risk M, Rays M, Eugen DV, Clardy J, Golik J, James JC, Nakanishi K, J.Am.Chem Soc, 81, 6773-6775(1981)に記載の方法により製造できる。

[0011] 用いる酸化剤としては、アルデヒドの酸化に用いることができる酸化剤を挙げることができ、過酸化水素が好ましい。

[0012] 酸化反応は、触媒の存在下で行なうことが好ましく、触媒として、通常の酸化触媒を用いることができ、 SeO_2 が好ましい。

[0013] 酸化反応は、以下の条件で好適に実施できる。

- ・反応温度 0～50°C (特に好ましくは 5～45°C、更に10～40°C:常温)
- ・反応圧力 0. 1～10MPa (特に好ましくは0. 5～5MPa:常圧)
- ・溶媒 有機極性溶媒 (i-ブタノールなどの低級アルコール系有機溶媒)
- ・触媒 SeO_2 などの酸化触媒
- ・酸化剤 過酸化水素などの酸化剤

[0014] 本発明の化合物(BTX-B5)は、他のブレベトキシン類に比べて、比較的多種類のブレベトキシンで汚染された貝類の中に良く見出され、しかも比較的安定であるため、貝類中に存在するBTX-B5を定量し、この化合物の存在の確認と含量をもって神経性貝毒による汚染の程度を知ることができる。よって、神経性貝毒の毒化のマーカーとしてこの化合物を用いることができ、貝類中の神経性貝毒の検出ができる。

実施例 1

[0015] BTX-B5の精製、単離

Whangarei産の毒化トリガイ(160kg)の殻を剥き、凍結真空乾燥し、そして、粉碎したのち、80%メタノールにより、還流(加熱)しながら、2回抽出した。抽出液を、 CH_2Cl_2 と H_2O の間で分配した。その有機物層を、さらに、n-ヘキサンと80%メタノールの間で分配した。そのメタノール層(109. 2g)を、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{--MeOH--H}_2\text{O}$ (95:5:0, 65:15:2, 65:20:3, 及び65:45:10)を用いる、 SiO_2 のクロマトグラフィー法分離を行って、fr1-1からfr1-4の4画分をそれぞれ得た。fr1-1、fr1-2及びfr1-3は、マウス評価において神経性中毒性を示した。マウス評価は以下のようにして行った。テスト試料のそれぞれを1% Tween 60-生理食塩水に懸濁し、18～22gのddYマウスに腹腔内注射により投与した。マウスを6時間の間は連続的に、6～15時間の間は1時間毎に観察した。マウスユニット(MU)毒性を公定法プロトコル(Delaney. J.E., 1985. Chapter 4: Bioassay procedures for shellfish toxins. In: Greenburg, Burg(Eds.). Laboratory procedures for the examination of sea water and shellfish, fifth ed, American Public Health Association Inc. Washington, DC. pp. 66-78.)にお

いて示された投与量—応答表から外挿した。BTX—B1及びPbTx—3のMUをマウス検出データに基づく3. 6及び4. 0 μ g/MUの変換係数をそれぞれ用いて変換した。

[0016] fr1—2及びfr1—3より、ODS—A₆₀ (YMC—Gel)を用い、fr2—1からfr2—6の画分を得た。70%及び80%MeOHを使用して溶出される二つの画分fr2—5及びfr2—6が活性を示した。次に、fr2—5をSephadex LH—20によるクロマトカラムグラフィー、最後に、YMC ODS—A₃₂₄ カラムクロマトグラフィーにかけBTX—B1 (12mg)を得た。

[0017] fr1—1を、MeOHを用いるSephadex LH—20、80%MeOHを用いるSepPak C₁₈、8 5%MeOHを用いるPuresil (Millipore) C₁₈、そして、最後に80%MeOHを用いるLiChroCART RP—18 (Merck)による連続的なカラムクロマトグラフィーにかけ、更なる高純度化を行い、PbTx—3 (約2. 4mg)を得た。

[0018] fr2—6を、MeOHを用いるSephadex LH—20、80%MeOHを用いるPuresil C₁₈ (\times 2)、そして、最後に80%MeOHを用いるLiChroCART RP—18での連続的なクロマトグラフィーを行うことによって、更に高純度化されたブレベトシキンB5 (BTX—B5) (約500 μ g)を得た。マウス評価によって、各溶出液の毒活性の有無を調べた。

実施例 2

[0019] BTX—B5の構造解析

実施例1で得られた毒性 BTX—B5は、次に示す性状を有する無色の無定形な固体である。

- FABMS m/z ネガティブ、909 (M—H)[—]; ポジティブ、933 (M+Na)⁺.
- HR—FBMS, m/z 933. 4645 (M+Na)⁺ (計算値 C₅₀H₇₀O₁₅, 933. 4642)

[0020] KBr錠剤での赤外スペクトル上の吸収3446, 1735, 1652, 1609, 1230, 1211 及び865cm^{—1}は、分子中にヒドロキシ基及び2つの共役カルボキシレート及びカルボキシル官能基の存在を示唆した。

この化合物は、PbTx—2及びBTX—B1と同様に、共役カルボキシレート及びカルボン酸発色基を有するために、紫外線スペクトル上に吸収(UV) λ max (MeOH) 205nm (ϵ 27, 300) 最高値吸収(吸収ピーク)を有する。

[0021] BTX—B5の1DプロトンNMR (CD₃OD)スペクトルは、PbTx—2のものと近似しているが、そのアルデヒドのシグナルがなく、そして、側鎖のタウリン基によるシグナルを

除いてBTX-B1のそれと実質的に同一である。(図1)

[0022] $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSYの測定結果より、BTX-B5とBTX-B1(2)との間でH2からH40のプロトンの結合状態(connectivities)、化学的シフト(chemical shifts)及び結合定数(coupling constants)において、良好な同一性が示された。以上のことから、BTX-B5は、BTX-B1と同様に、同じポリエステル部分及び立体化学構造を有している。

[0023] C40-C41(C50)-C42は、H50とH40の間の見られるアリル結合、並びに、H50とC42の間のHMBC相関によって確認された。よって、BTX-B5の側鎖中のC42の官能基は、-COOHである。(図2)

[0024] BTX-B5(MeOH)は、CDスペクトルにおいて

- ・ネガティブ 最大($\Delta \epsilon$ -5.78エン-ラクトン $\pi \pi^*$)at 227nm および
- ・ポジティブ 最大($\Delta \epsilon$ +6.88エン-ラクトン $n \pi^*$)at 257nm

を示したが、それらは、BTX-B1及びPbTx-2において見出されたものと類似である。H35からH40-2の間のNOEsは、その側鎖が β -配向性であることを示した。これらの結果は、BTX-B5が、PbTx-2と同じ絶対配置(absolute configuration)を有することを示す。

[0025] 提案した構造式は、BTX-B5の(M-H)⁻イオン(m/z909)について行われた、衝撃的活性化解離(collisionally activated dissociation)法によるネガティブイオン FAB MS/MS実験によって、良くサポートされている。

[0026] C37-C36及びC39-Oの間の結合開裂は、イオンm/z111(図3)の生成によって、証明された。他の主要なイオンは、報告されているBTX-B2において観測されているように(Murata K, Satake M, Naoki H, Kaspar HF, Yasumoto T, Tetrahedron 54, 735-742(1998))、エーテル環における特徴的な結合開裂によって生成し、そして、提案した構造式とも一致した。

実施例 3

[0027] BTX-B5の合成

1) 室温下、 SeO_2 (0.5mg)を含むt-BuOH(1ml)にPbTx-2(1.0mg)を溶解した溶液に、攪拌しながら30% H_2O_2 (0.5ml)を除々に加えた。添加4時間後、反応液を水(9ml)で希釈したのち固相カラムOasis HLB plus cartridges (Waters製)にアプライ

した。70%メタノール(5ml)で洗浄後、90%メタノールで生成物を溶出させた。この方法で、約0.9mgのBTX-B5を得た。

2) BTX-B5の合成

室温下、メタノール(1ml)にPbTx-2(1.0mg)を溶解した溶液に、攪拌しながら5%NaClO₂(1.0ml)を徐々に加えた。添加4時間後、反応液を水(9ml)で希釈したのち固相カラムOasis HLB plus cartridges (Waters製)にアプライした。70%メタノール(5ml)で洗浄後、90%メタノールで生成物を溶出させた。この方法で、約0.9mgのBTX-B5を得た。

実施例 4

[0028] BTX-B5の定量

HPLC条件:カラム、Cadenza CD-C18(3mm×150mm, 3 μ m);移動相、20分間の0.1%ギ酸-アセトニトリルのグラジエント(20→80%アセトニトリル);流速、0.2 mL/min; 20 μ L注入。コーン電圧は、100Vで設定され、衝突誘起解離は、75eVの衝突エネルギーで実施された。アルゴンが、衝突ガスとして使用された。

[0029] 液体クロマトグラフィータンデムマススペクトリーによってBTX-B5は、PbTx-3と共に、1993年の初期のNSPの発生時に収穫されたニュージーランド産の毒化貝トリガイ類、ムラサキイガイ(Perna(P.) conaliculus)及び沖カキ中に見出された。一方、高いレベルと低いレベルのBTX-B1が、トリガイ及び沖カキの2つの貝で、それぞれ、確認された。(図4)

[0030] 前述のようにして単離されたBTX-B5の腹腔内投与での最小致死量(minimum lethal dose)は、約0.3-0.5mg/kgであった。注入後直ちに、その被検体動物は、他のブレベトキシン類によって引き起こされるものと極めて類似した神経性中毒症状を発現した。

[0031] 興味深いことには、PbTx-1、PbTx-2、及びPbTx-3のような幾つかのブレベトキシン類が渦鞭毛藻 G. breveによって、おおよそ1/7/2の割合において産生されることがよく知られているけれども、強力な魚類性毒物のPbTx-1及びPbTx-2は、トリガイ類において、有為的なレベルで見出せないが、より魚類性毒性と致死性毒性の低いBTX-B3、BTX-B1及びBTX-B5は、約5/25/1の比率で見出される。

[0032] 極最近、高濃度のPbTx-3およびBTX-B5が、同じムラサキイガイ中に見出された。これらの分析データに基づくと、PbTx-3、BTX-B5、及びBTX-B1が、トリガイのNSPに関係した毒力に対応し、一方ムラサキイガイはPbTx-3、BTX-B5並びにBTX-B2、B3及びB4、及び沖カキはPbTx-3及びBTX-B5が対応することが示された。

[0033] このように、BTX-B5およびPbTx-3は、*G. breve*の赤潮発生(algal bloom)後の貝の毒化を監視する優れたマーカーであり得る。BTX-B2、BTX-B3、及びBTX-B4は、トリガイからのみ得られているので、ブレベトキシンの代謝は、種特異的であることを示唆している。

[0034] ブレベトキシン類、特に、PbTx-1及びPbTx-2が、酸性及び塩基性の条件では、いずれも不安定であることが報告されていた。

PbTx-2のアルデヒド末端基が、マイルドな条件下の選択的酸化によって、対応するカルボン酸基に容易に変換されることが新たに見出された。解毒のためにPbTx-2は全ての3つの貝類中でBTX-B5へ代謝され、BTX-B5の多くはトリガイ内の酵素によってBTX-B1へ変換されることで消滅されるが、ムラサキイガイ及び沖カキ中の酵素によってはこの変換率はわずかである。この代謝は人体中におけるアルデヒド解毒経路と似ているので、我々の提案するトリガイ中のブレベトキシン類の解毒経路の解明は、人のNSP中毒の治療に有益な知見を提供すると考えられる。

[0035] 関連するブレベトキシン代謝に関わるメカニズム及び酵素は、今後更に詳細に明らかにする必要がある。

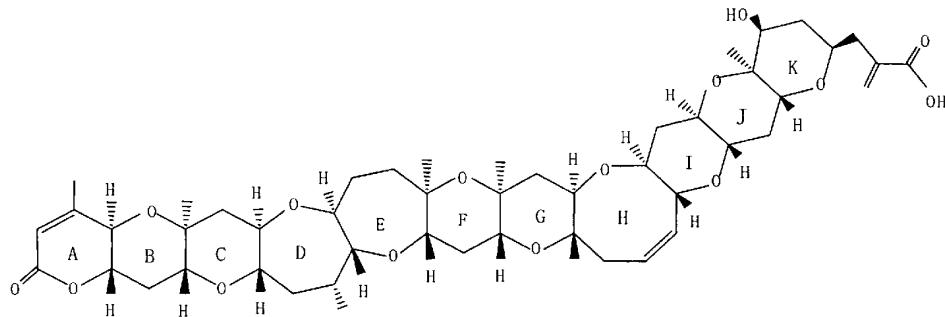
ブレベトキシン及びそれらの類似体に対するタンデムマススペクトロメトリー技術と連結した液体クロマトグラフィーを用いる高感度分析法は、貝毒のモニタリング及び代謝の研究にとって重要である。

産業上の利用可能性

[0036] 本発明におけるブレベトキシン類縁体の一つで、新規な化合物(BTX-B5)は、貝中の神経性貝毒の有無を調べる際に毒化マーカーとして使用することができるので、水産分野における食品企業、漁業組合などでの貝毒のモニタリングに使用できる。

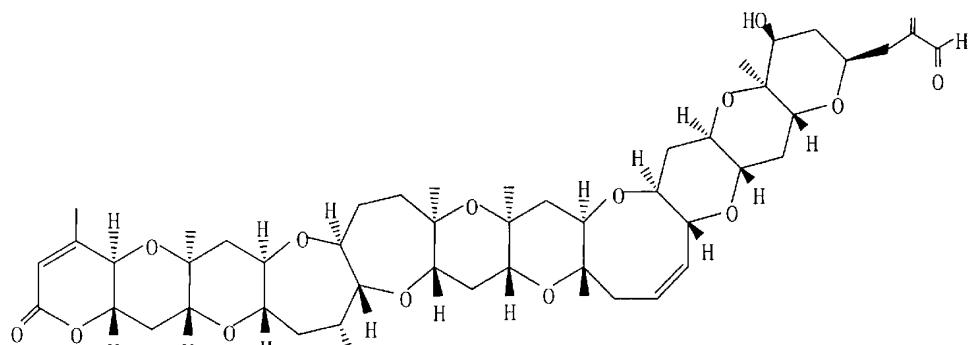
請求の範囲

[1] 式(I) :



を有する化合物。

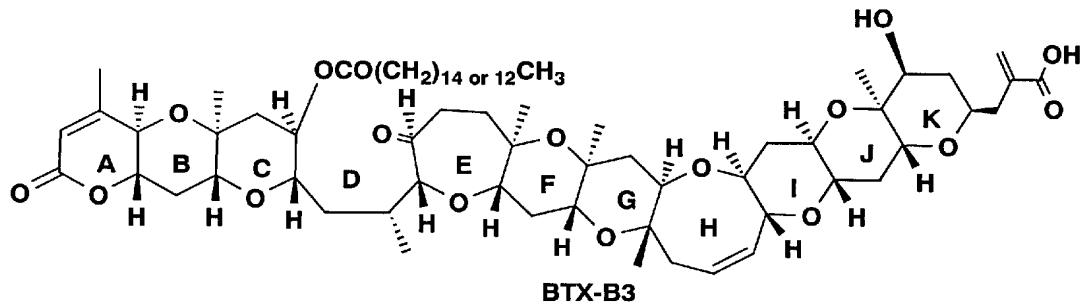
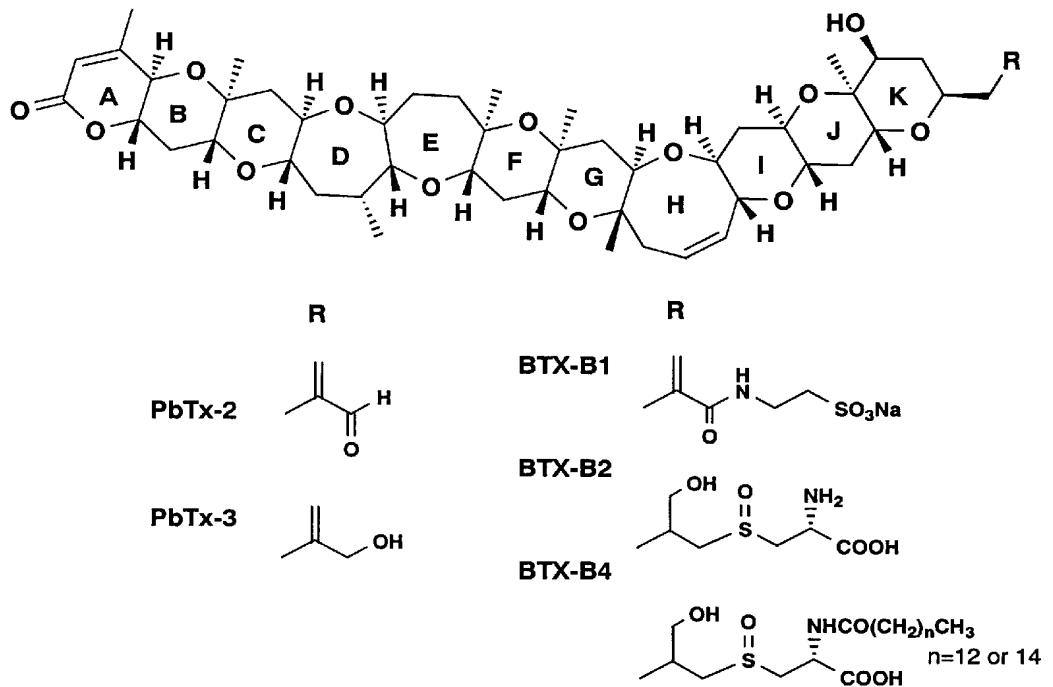
[2] 式(II) :



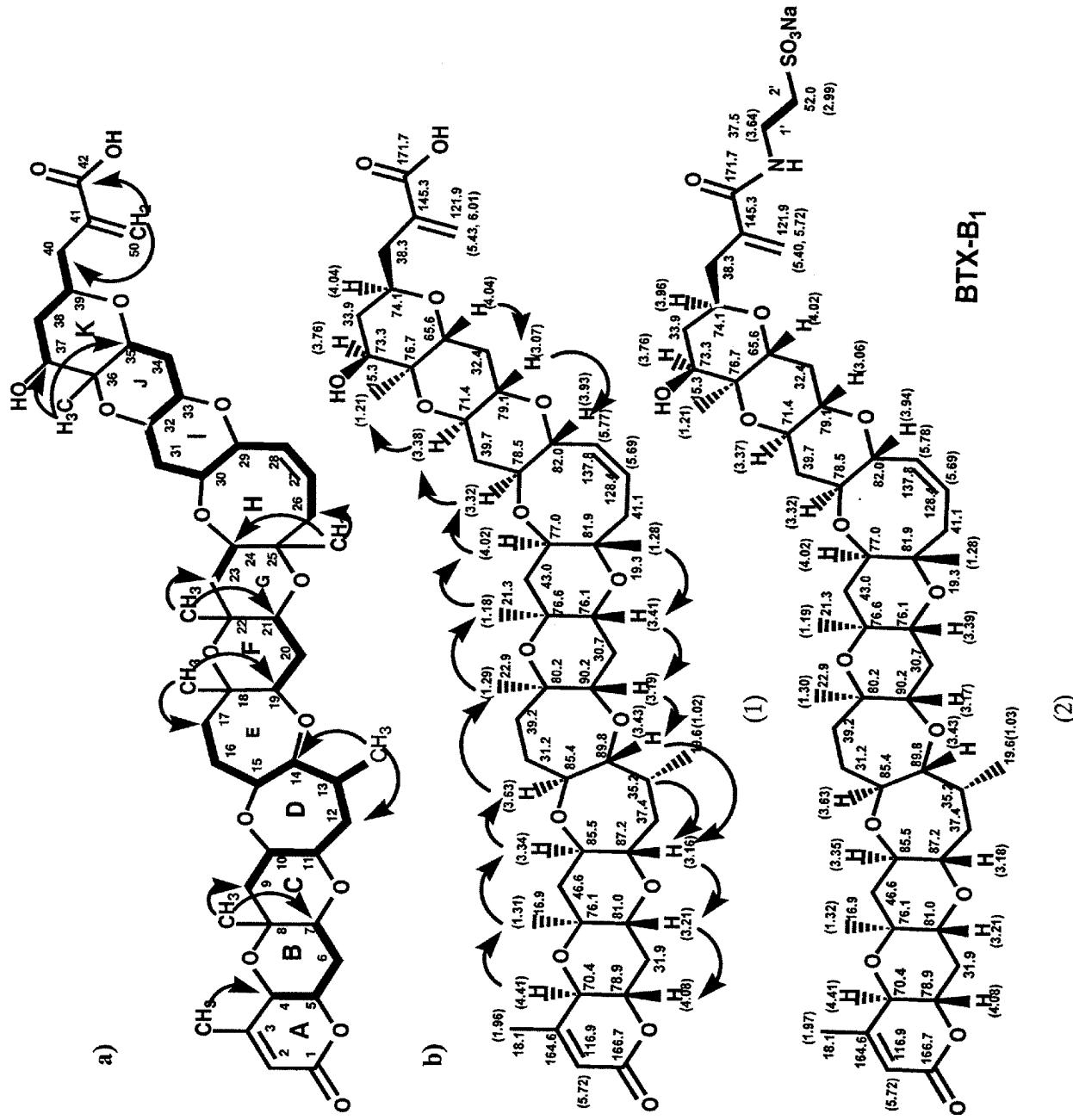
を有する化合物の末端に位置するアルデヒド基を酸化してカルボキシ基とすることを含む、請求項1記載の式(I)を有する化合物の製造方法。

[3] 貝類中に存在する請求項1記載の式(I)を有する化合物を定量すること、およびこれを神経性貝毒による毒化マーカーとして使用することを含む、貝類中の神経性貝毒の検出方法。

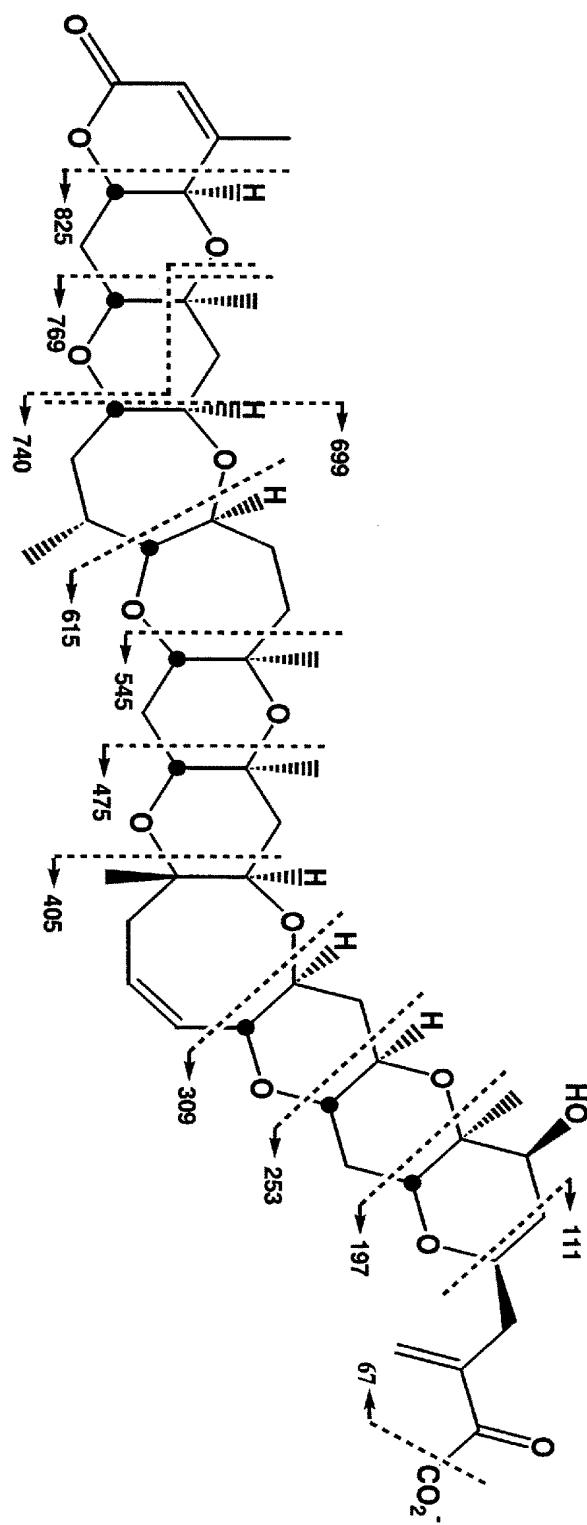
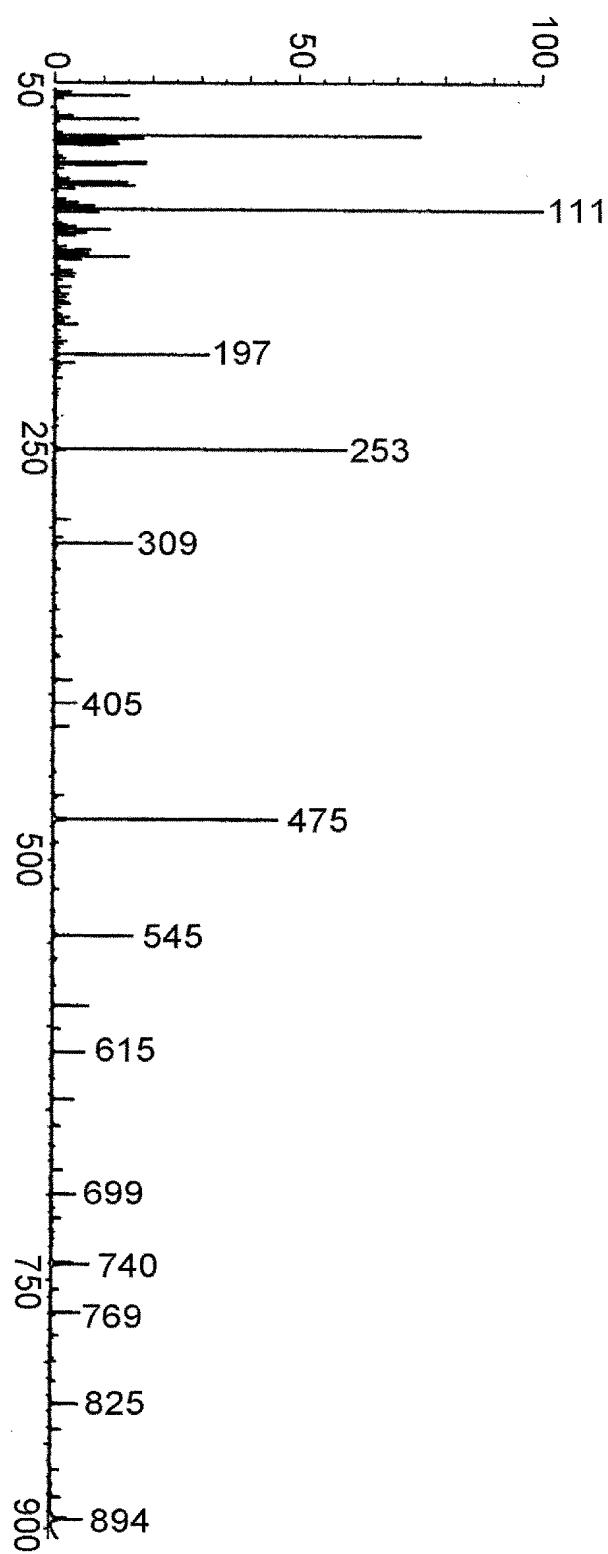
[図1]



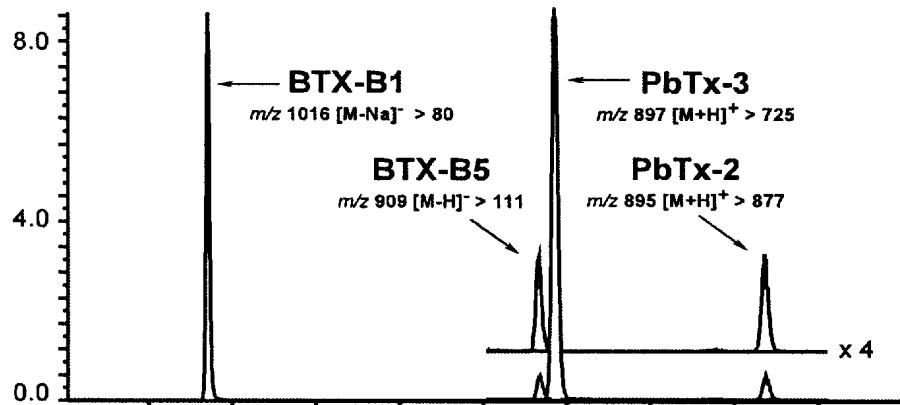
[図2]



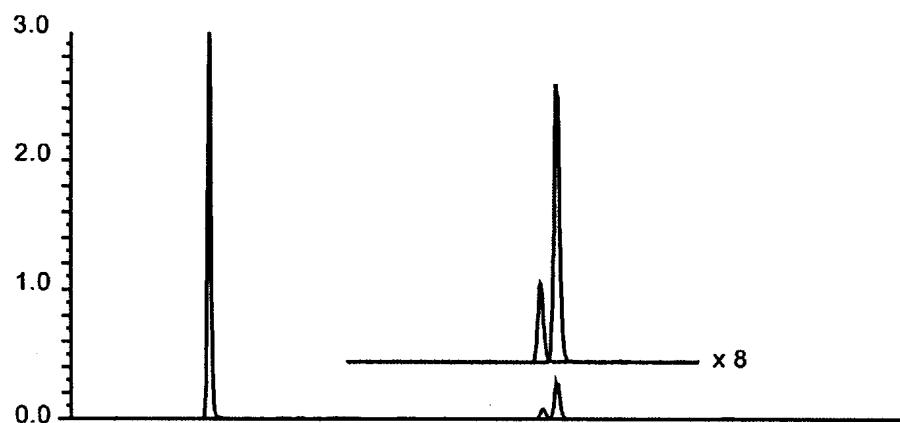
[図3]



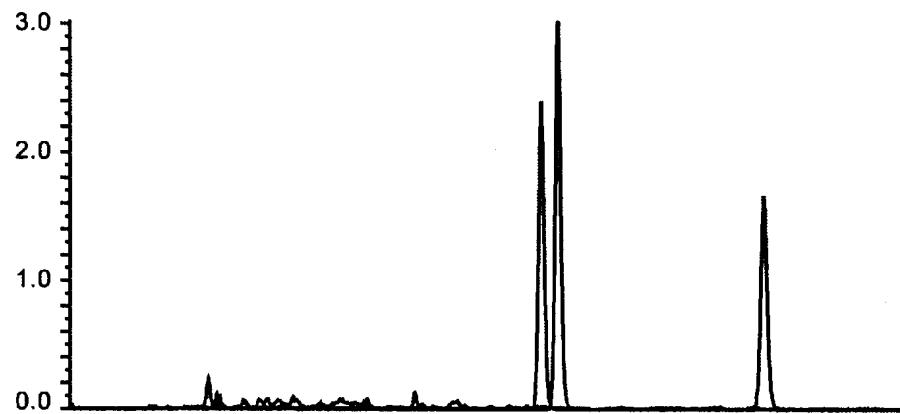
[図4A]



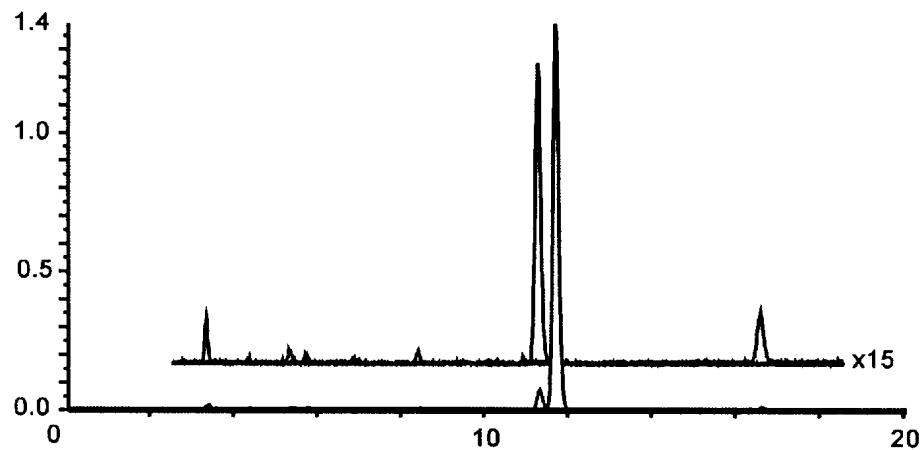
[図4B]



[図4C]



[図4D]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017598

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C07D493/22, G01N33/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C07D493/22, G01N33/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLus (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X A | REIN, Kathleen S. et al., Brevetoxin B: Chemical Modifications, Synaptosome Binding, Toxicity, and an Unexpected Conformational Effect, Journal of Organic Chemistry, 1994, 59(8), pages 2107 to 2113 | 1, 2 3 |
| X A | POLI, Mark A. et al., Radioimmunoassay for PbTx-2-type brevetoxins: epitope specificity of two anti-PbTx sera, Journal of AOAC International, 1995, 78(2), pages 538 to 542 | 1, 2 3 |

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

| | |
|---|--|
| * Special categories of cited documents: | |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | "&" document member of the same patent family |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |

Date of the actual completion of the international search
18 January, 2005 (18.01.05)

Date of mailing of the international search report
01 February, 2005 (01.02.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017598

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| P, X | ISHIDA, Hitoshi et al., Brevetoxin B5, a new brevetoxin analog isolated from cockle <i>Austrovenus stutchburyi</i> in New Zealand, the marker for monitoring shellfish neurotoxicity, <i>Tetrahedron Letters</i> , 2004, 45(1), pages 29 to 33 | 1-3 |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. C17 C07D 493/22, G01N 33/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. C17 C07D 493/22, G01N 33/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
C A P I U S (S T N) , R E G I S T R Y (S T N)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| X | REIN, Kathleen S. et al., Brevetoxin B: Chemical | 1, 2 |
| A | Modifications, Synaptosome Binding, Toxicity, and an Unexpected Conformational Effect, Journal of Organic Chemistry, 1994, 59(8), p. 2107-2113 | 3 |
| X | POLI, Mark A. et al., Radioimmunoassay for PbTx-2-type | 1, 2 |
| A | brevetoxins: epitope specificity of two anti-PbTx sera, Journal of AOAC International, 1995, 78(2), p. 538-542 | 3 |

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す
もの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日
以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行
日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する
文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって
出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論
の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明
の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以
上の文献との、当業者にとって自明である組合せに
よって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 01. 2005

国際調査報告の発送日

01. 2. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小堀 麻子

4 C 3336

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | |
| P X | ISHIDA, Hitoshi et al., Brevetoxin B5, a new brevetoxin analog isolated from cockle <i>Austrovenus stutchburyi</i> in New Zealand, the marker for monitoring shellfish neurotoxicity, <i>Tetrahedron Letters</i> , 2004, 45(1), p. 29-33 | 1-3 |